

Evaluasi Deteksi Berbasis PCR untuk Bakteri *Bifidobacterium longum* dalam Sampel Feses Bayi dari Kota Manado

Beivy Jonathan Kolondam^{1*)}

¹⁾Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi, Manado 95115

*Corresponding author: beivy.kolondam@unsrat.ac.id

(Article History: Received 24-01-2020; Accepted 06-04-2020; Published 06-04-2020)

ABSTRAK

Bifidobakteria merupakan mikroflora yang umum hidup dalam usus manusia sejak bayi. Peran *Bifidobacterium longum* yang positif sebagai salah satu bakteri yang menunjang kesehatan inangnya membuat bakteri ini menjadi objek studi yang menarik. Salah satu instrumen dalam penelitian adalah metode deteksi bakteri *B. longum* yang berbasis PCR (Polymerase Chain Reaction) gen 16S rRNA. Dengan mempertimbangkan bahwa perancangan primer untuk deteksi ini sudah lebih dari 20 tahun, penelitian ini bertujuan mengevaluasi hasil deteksi melalui PCR terhadap *B. longum* dalam feses bayi. Akurasi hasil dilihat melalui sekuensing terhadap hasil PCR sampel yang terdeteksi positif. Dua sampel feses bayi di Manado yang diperiksa menunjukkan hasil positif dan produk PCR tersebut dilakukan sekuensing. Panjang DNA yang nyata dari hasil deteksi ini yaitu 829 bp dan bukan 831 bp. Sekuens DNA kedua sampel ini identik satu sama lain. Hasil BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) mengonfirmasi kesamaan 100% (identik) dari kedua specimen dari Kota Manado dengan sekuens gen 16S rRNA specimen bakteri *B. longum* yang telah ada dalam GenBank.

Kata-kata kunci: *Bifidobacterium longum*, Polymerase Chain Reaction, deteksi, feses, bayi.

Evaluation of PCR-Based Detection for *Bifidobacterium longum* in Infant Fecal Samples from Manado City

ABSTRACT

Bifidobacteria are common members of the gut microflora of humans since infant. The *Bifidobacterium longum* has positive roles and one of supportive bacteria to the host, which made interesting as a study object. One instrument in studying this bacterial species is the detection method based on PCR of 16S rRNA gene. In consideration of the design of primers for this detection method is already more than 20 years, this research aimed to evaluate the PCR-based detection of *B. longum* in infant feces. The accuracy of the method was evaluated from sequencing of DNA fragment from positive results. Two fecal samples in Manado City shown positive result were sent for sequencing. The actual length of DNA amplified by PCR was 829 bp, not 831 bp. The DNA sequence of both samples were identical to each other. The BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) result confirmed the similarity of both samples from Manado with 16S rRNA gene sequence of *B. longum* specimens in GenBank.

Keywords: *Bifidobacterium longum*, Polymerase Chain Reaction, detection, feces, infant.

PENDAHULUAN

Bifidobakteria merupakan penghuni alami dari saluran pencernaan manusia yang telah ada dalam usus sejak bayi (Ventura *et al.*, 2012). Golongan bakteri ini memiliki peran positif untuk menunjang kesehatan inangnya (Tojo *et al.*, 2014). Meskipun demikian, mekanisme ini belum diketahui secara jelas. Untuk itulah maka berbagai studi tentang genom bakteri ini selalu dilakukan (Motherway *et al.*, 2011). Meski terdapat perbedaan prevalensi dari masing-masing spesies Bifidobakteria, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* tersebar secara luas dalam usus orang dewasa, manula dan juga pada bayi yang baru lahir (Turrone *et al.*, 2009; Gavini *et al.*, 2001).

Dengan dirancangnya primer-primer PCR yang spesifik untuk berbagai jenis Bifidobakteria oleh Matsuki *et al.* (1999), termasuk untuk *B. longum*, proses deteksi dan identifikasi bakteri ini sangat mendukung penelitian-penelitian ekologi mikroba, nutrisi dan klinis (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2018; Oki *et al.*, 2018). Perancangan primer tersebut berbasis pada gen 16S rRNA sebagai target. Deteksi dan identifikasi Bifidobakteria menggunakan primer-primer ini sangat bermanfaat karena *B. longum* adalah salah satu dari enam spesies yang secara umum sebagai mikroflora usus (Temmerman *et al.*, 2004).

Mempertimbangkan bahwa perancangan primer ini sudah lebih dari 20 tahun sejak dipublikasikan, maka penelitian ini bertujuan untuk melakukan evaluasi sederhana dari deteksi atau diagnostik PCR terhadap *Bifidobacterium longum* dalam feses bayi. Dalam studi ini diuji keakuratan metode yang dirancang primernya oleh Matsuki *et al.* (1999) yang sudah banyak digunakan dalam penelitian. Spesimen feses diambil dari bayi di Kota Manado, Provinsi Sulawesi Utara. Akurasi metode diagnostik ini dilihat dengan melakukan sekuensing terhadap hasil PCR yang dianggap positif.

METODE PENELITIAN

Koleksi Sampel dan Isolasi DNA Total

Dua sampel feses diambil dari dua bayi (berusia 30 hari) di Kota Manado menggunakan spatula steril dan dimasukkan ke dalam tabung Falcon 15 ml. Sampel ini segera dipreservasi dengan didinginkan

selama 6 jam dalam lemari es (4°C) sebelum proses isolasi DNA. Isolasi DNA total dari sampel feses dilakukan menggunakan UltraClean Fecal DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Inc.) sesuai petunjuk manual.

Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Elektroforesis

Proses PCR dilakukan menggunakan MyTaq™ HS Red Mix (Bioline). Pasangan primer yang digunakan dalam primer ini berdasarkan Matsuki *et al.* (1999) yaitu BiLON-1 (5'-ttc cag ttg atc gca tgg tc-3') and BiLON-2 (5'-ggg aag ccg tat ctc tac ga-3'). Reaksi PCR sebanyak 50 ul terdiri atas komponen 25 ul 2x MyTaq™ HS Red Mix, 1,5 ul masing-masing primer (10 uM), 20 ul Milli-Q water steril, dan 2 ul DNA total sampel.

Pengaturan panas mesin PCR menggunakan suhu penempelan primer yang sama dengan Matsuki *et al.* (1999), dengan perubahan sesuai rekomendasi manual kit PCR yang digunakan. Pemanasan dimulai dengan denaturasi awal 95°C (3 menit) dan dilanjutkan dengan 35 siklus denaturasi 95°C (15 detik), perlekatan primer 55°C (20 detik) dan pemanjangan DNA 72°C (20 detik). Untuk pemanjangan akhir digunakan suhu 72°C (1 menit).

Hasil PCR diseparasi menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%. Sebanyak 10 ul produk PCR sampel dan juga DNA ladder 1 kb dengan jumlah yang sama dimasukkan ke dalam sumur-umur gel dan kemudian dialiri arus listrik 100 volt selama 30 menit. Gel direndam dalam cairan yang mengandung etidium bromide selama 10 menit dan diamati keberadaan pita DNA tunggal dengan panjang 831 bp, sesuai Matsuki *et al.* (1999), dalam gel agarosa. Pita DNA ini berada di antara pita DNA standar berukuran 750 bp dan 1000 bp.

Sekuensing DNA

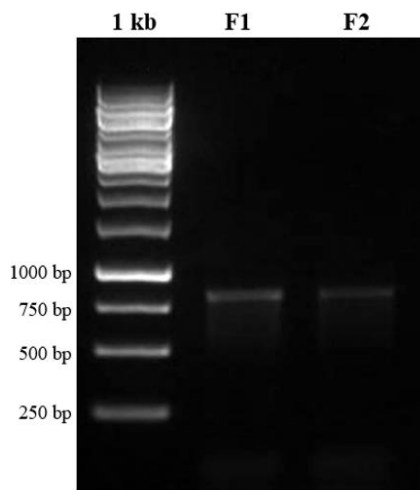
Pita DNA hasil PCR dilakukan sekuensing dua arah. Sekuensing dilakukan menggunakan masing-masing primer PCR di First Base C.O. (Malaysia). Kromatogram hasil sekuensing disunting menggunakan piranti lunak Geneious 5.6 (Drummond *et al.*, 2012) yang diawali dengan menggabungkan hasil sekuensing dari kedua primer menggunakan algoritma MUSCLE (Edgar, 2004). Penyuntingan dilanjutkan dengan

menentukan area penempelan primer di daerah 5' dan 3' sekuens. Sekuens DNA di antara area penempelan primer ini digunakan untuk identifikasi (Kolondam, 2015). Sekuens DNA yang sudah bersih ini dibandingkan kesamaanya dengan semua sekuens yang ada dalam Genbank melalui *Basic Local Alignment Search Tool* (Altschul *et al.*, 1990) atau BLAST yang tersedia secara daring (www.ncbi.nlm.nih.gov).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Elektroforesis Gel Agarosa dari Hasil PCR

Deteksi keberadaan bakteri *B. longum* dari sampel feses menunjukkan keduanya memberikan hasil deteksi positif. Ini terlihat dari munculnya pita yang berukuran antara 750 bp dan 1000 bp (Gambar 1) dari perbandingannya dengan DNA standar 1 kb yang digunakan.



Gambar 1. Elektroforesis gel agarosa 1% hasil PCR untuk deteksi *Bifidobacterium longum*

Hal ini sesuai dengan panjang yang diharapkan dalam Matsuki *et al.* (1999) yang merancang bahwa hasil PCR yaitu berupa pita DNA tunggal berukuran 831 bp untuk dikategorikan sebagai hasil diagnostik positif. Pita yang dihasilkan berupa pita tunggal yang jelas dari dokumentasi elektroforesis gel agarosa.

Evaluasi Panjang Pita DNA Hasil PCR

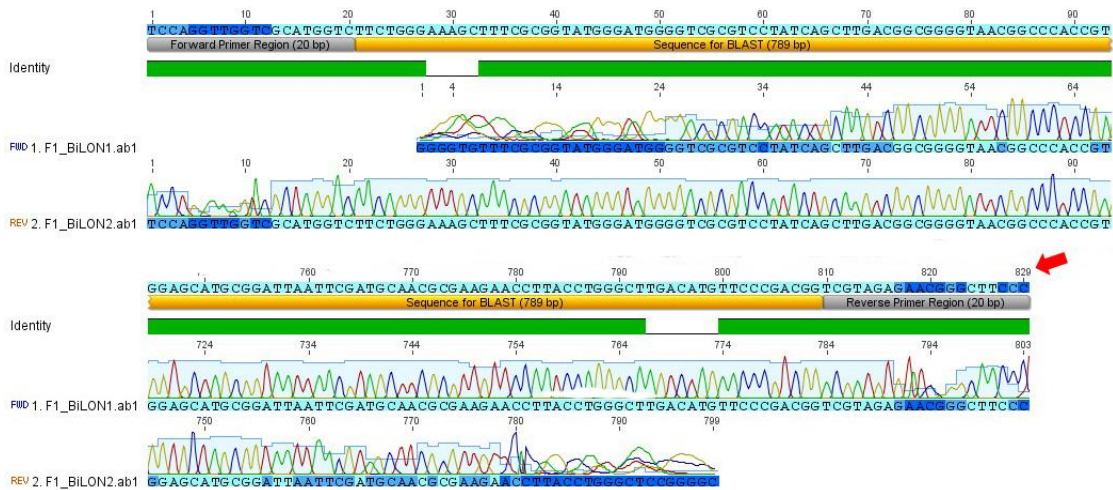
Konfirmasi keakuratan diagnostik PCR dalam penelitian ini salah satunya

dilakukan dengan melihat sekuens pita DNA yang berhasil diamplifikasi (amplikon) melalui PCR. Kedua sampel DNA telah disunting sekuens DNANYa berdasarkan kualitas kromatogram. Daerah penempelan primer (diberi label “*forward primer region*” dan “*reverse primer region*”) telah ditentukan lebih dahulu untuk kemudian ditentukan daerah di antara kedua primer tersebut yang akan digunakan untuk identifikasi sekuens secara molekuler melalui GenBank.

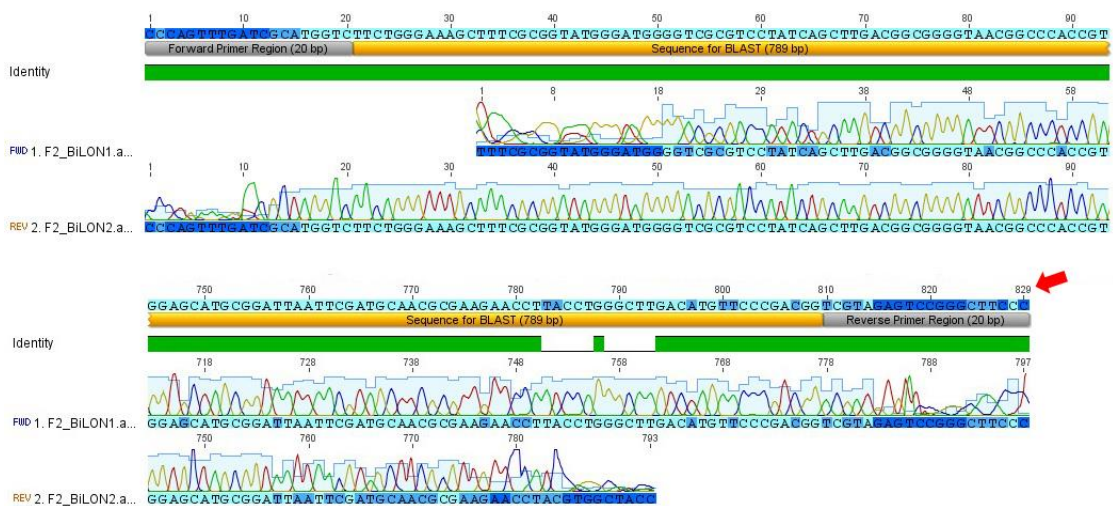
Berdasarkan sekuens DNA hasil PCR, panjang keseluruhan amplikon kedua spesimen (F1 dan F2) adalah 829 bp (Gambar 2 dan Gambar 3, ditunjukkan oleh gambar panah berwarna merah). Panjangnya bukan tepat 831 bp seperti yang dirancang Matsuki *et al.* (1999) yang menjadi acuan untuk metode deteksi ini. Pada Gambar 2 dinotasikan untuk amplikon sampel F1 bahwa terdapat 20 nukleotida di awal sebagai primer maju (forward) yaitu BiLON-1 dan juga 20 nukleotida di akhir sebagai primer mundur (reverse) yaitu BiLON-2. Hal yang sama ditunjukkan oleh amplikon sampel F2 pada Gambar 3

Perbedaan panjang pita hasil PCR diagnostik dinilai sebagai sebuah kewajaran dengan pertimbangan bahwa referensi perancangan primer BiLON-1 dan BiLON-2 dari Matsuki *et al.* (1999) ini menggunakan sekuens 16S rRNA dari *Escherichia coli* (Neefs *et al.*, 1991). Secara otomatis juga penomoran semua primer dalam artikel ini mengikuti satu acuan (*E. coli*) untuk memperkirakan panjang.

Dalam penelitian Moreno *et al.* (2002), Ward *et al.* (1998) dan Yatsunenکو *et al.* (2012) menggambarkan bahwa perbandingan gen 16S rRNA, baik intraspecies maupun interspecies, akan terdapat variasi nukleotida dan variasi panjang dari specimen-spesimen yang ada. Variasi panjang nukleotida ini tidak berpengaruh untuk hasil diagnostik karena perbedaan dua nukleotida akan sulit dibedakan dalam elektroforesis gel agarosa.



Gambar 2. Bagian ujung DNA 5' dan 3' dari penjajaran kromatogram Sampel F1

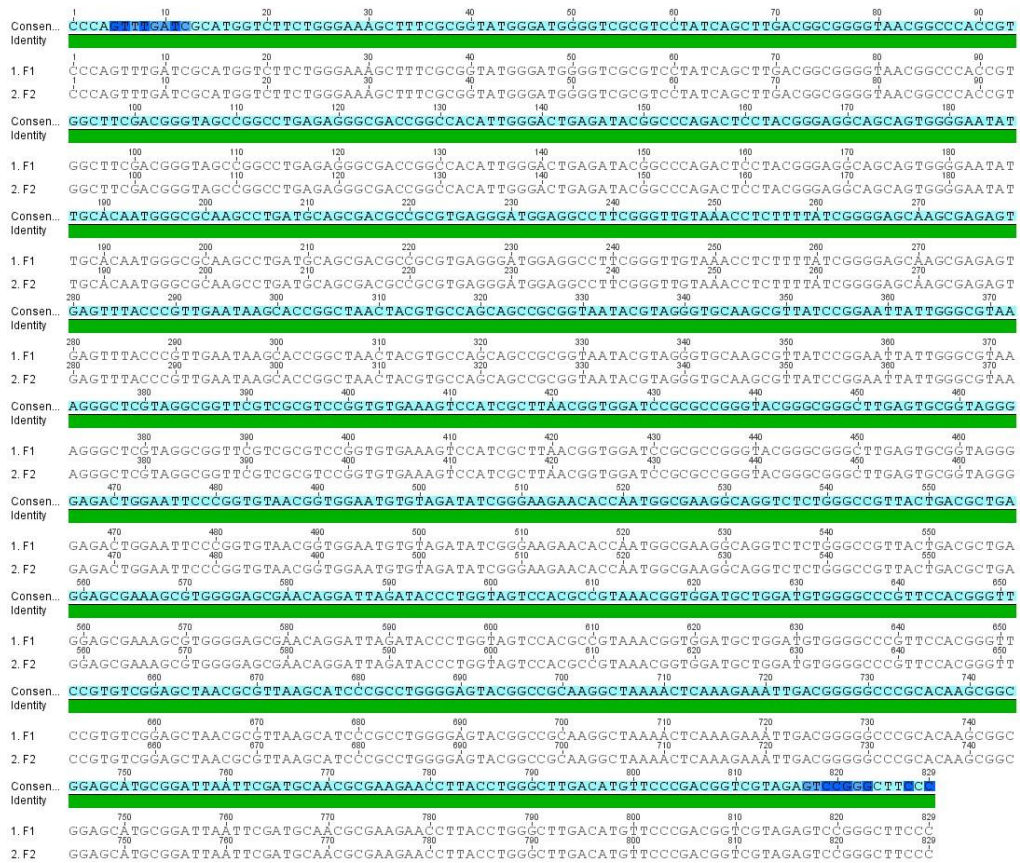


Gambar 3. Bagian ujung DNA 5' dan 3' dari penjajaran kromatogram Sampel F2

Konfirmasi Sekuens Amplikon

Kedua sampel yang digunakan dalam penelitian ini memiliki sekuens dengan tingkat kesamaan 100% atau keduanya identik (Gambar 4). Sekuens gen 16S rRNA sepanjang 789 bp dari masing-masing sampel penelitian yang dibandingkan satu sama lain, juga dibandingkan dengan seluruh sekuens yang ada dalam database GenBank NCBI (National Center for Biotechnology

Information). Ini digambarkan dalam Tabel 1, semua spesimen (hampir 100 spesimen) yang terdaftar dalam GenBank juga memiliki kemiripan 100% dengan sampel penelitian. Cakupan panjang DNA dari sekuens pembanding (*query coverage*) juga mencapai 100%. Ini menandakan bahwa tingkat kesamaan (*maximum identity*) diperoleh lewat cakupan yang sebanding antara sampel dalam penelitian ini dengan spesimen pembanding di GenBank.



Gambar 4. Penjajaran hasil sekuensing spesimen F1 dan F2

Tabel 1. Identifikasi Sekuens Gen 16S rRNA Sampel Penelitian Hasil Diagnostik menggunakan Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) tanggal 16 Januari 2020

Nama Spesimen	Query Coverage	Maximum Identity	Nomor Akses GenBank	Sumber Spesimen	Referensi
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	100%	100%	AP010890.1	Manusia dewasa (Japan)	Fukuda <i>et al.</i> (2011)
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	100%	100%	HM009032.1	Manusia dewasa (France)	Messaoudi <i>et al.</i> (2011)
<i>Bifidobacterium longum</i>	100%	100%	CP043002.1	Manusia dewasa (China)	Xiao <i>et al.</i> (2019)
<i>Bifidobacterium longum</i>	100%	100%	JN004063.1	<i>Carassius gibelio</i> (Czech Republic)	Vlková <i>et al.</i> (2012)
<i>Bifidobacterium longum</i>	100%	100%	KU321257.1	Manusia dewasa (Finland)	Priha <i>et al.</i> (2016)
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	100%	100%	AB733110.1	Bayi (Thailand)	Uraipan dan Hongpattarakere (2015)
<i>Bifidobacterium longum</i>	100%	100%	KY448279.1	Bayi (India)	Achi dan Halami (2019)
<i>Bifidobacterium longum</i>	100%	100%	MN372103.1	Manusia (China)	Wei (2019)

Lewat perbandingan dengan BLAST, dapat dikonfirmasi bahwa pita DNA (dari dua sampel) hasil deteksi PCR adalah benar hanya mengamplifikasi gen targetnya yaitu gen 16S rRNA dari *B. longum* saja. Di samping banyaknya bakteri yang terkandung dalam DNA total sampel feses, target deteksi yang dilakukan dengan kondisi PCR standar ini dinilai akurat.

KESIMPULAN

Deteksi bakteri *B. longum* melalui metode berbasis PCR berdasarkan Matsuki *et al.* (2019) mampu mendeteksi adanya bakteri ini dalam dua spesimen feses bayi di Kota Manado. Panjang DNA nyata hasil diagnostik ini adalah 829 bp, bukan 831 bp seperti yang diperoleh dari pengukuran dengan acuan DNA *E. coli* dalam publikasi. Keakuratan metode deteksi ini telah berhasil dikonfirmasi oleh hasil BLAST sebagai sekuens gen 16S rRNA dari *B. longum* dengan hasil identik dengan semua pembandingnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Achi, S.C. & P.M. Halami. 2019. In Vitro Comparative Analysis of Probiotic and Functional Attributes of Indigenous Isolates of Bifidobacteria. *Curr. Microbiol.*, 76: 304–311.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, & D.J. Lipman. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3): 403–410.
- Drummond A.J., B. Ashton, S. Buxton, M. Cheung, A. Cooper A, C. Duran, M. Field, J. Heled, M. Kearse, S. Markowitz, R. Moir, S. Stones-Havas, S. Sturrock, T. Thierer & A. Wilson. 2012. Geneious v5.6. New Zealand.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: Multiple Sequence Alignment with High Accuracy and High Throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5): 1792–1797.
- Fukuda, S., H. Toh, K. Hase, K. Oshima, Y. Nakanishi, K. Yoshimura, T. Tobe, J.M. Clarke, D.L. Topping, T. Suzuki, T.D. Taylor, K. Itoh, J. Kikuchi, H. Morita, M. Hattori & H. Ohno. 2011. Bifidobacteria can Protect from Enteropathogenic Infection through Production of Acetate. *Nature*, 469: 543–547.
- Gavini, F., C. Cayuela, J. Antoine, C. Lecoq, B. Lefebvre, J. Membré & C. Neut. 2001. Differences in the Distribution of Bifidobacterial and Enterobacterial Species in Human Faecal Microflora of Three Different (Children, Adults, Elderly) Age Groups. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 13(1): 40–45.
- Hernández-Rodríguez, D., A.A. Vásquez-Aguilar, J.C. Serio-Silva, E. Rebollar, A. Azaola-Espinosa. 2018. Molecular Detection of Bifidobacterium spp. in Faeces of Black Howler Monkeys (*Alouatta pigra*). *J. Med. Primatol.* 48(2): 99–105.
- Kolondam, B.J. 2015. Applying matK Gene for Identification of Liliopsida Plant Species from North Sulawesi through Bold Systems. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 6(2): 242–245.
- Matsuki, T., K. Watanabe, R. Tanaka, M. Fukuda & H. Oyaizu. 1999. Distribution of Bifidobacterial Species in Human Intestinal Microflora Examined with 16S rRNA Gene-targeted Species-specific primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4506–4512.
- Messaoudi, M., R. Lalonde, N. Violle, H. Javelot, D. Desor, A. Nejd, J.F. Bisson, C. Rougeot, M. Pichelin & J. Cazaubiel. 2011. Assessment of Psychotropic-like Properties of a Probiotic Formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in Rats and Human Subjects. *British Journal of Nutrition*, 105(5): 755–764.

- Moreno, C., J. Romero & R.T. Espejo. 2002. Polymorphism in Repeated 16S rRNA Genes is a Common Property of Type Strains and Environmental Isolates of the Genus *Vibrio*. *Microbiology*, 148: 1233–1239.
- Motherway, M.O.C. A. Zomer, S.C. Leahy, J. Reunanen, F. Bottacini, M. J. Claesson, F. O'Brien, K. Flynn, P. G. Casey, J.A.M. Munoz, B. Kearney, A.M. Houston, C. O'Mahony, D.G. Higgins, F. Shanahan, A. Palva, W.M. de Vos, G.F. Fitzgerald, M. Ventura, P.W. O'Toole & D. van Sinderen. 2011. Functional Genome Analysis of *Bifidobacterium breve* UCC2003 Reveals Type IVb Tight Adherence (Tad) Pili as an Essential and Conserved Host-colonization Factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108: 11217–11222.
- Neefs, J.-M., Y.V. de Peer, P.D. Rijk, A. Goris & R.D. Wachter. 1991. Compilation of Small Ribosomal Subunit RNA Sequence. *Nucleic Acids Res.*, 19: 1987–2015.
- Oki, K., T. Akiyama, K. Matsuda, A. Gawad, H. Makino, E. Ishikawa, K. Oishi, A. Kushiro & Junji Fujimoto. 2018. Long-term Colonization Exceeding Six Years from early Infancy of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* in Human Gut. *BMC Biology*, 18(1): 209.
- Priha, O., M. Raulio, J. Maukonen, A. Vehviläinen & E. Storgårds. 2016. Bacterial Populations on Brewery Filling Hall Surfaces as Revealed by Next Generation Sequencing. *Biofouling*, 32(5): 571-581.
- Tojo, R., A. Suárez, M.G. Clemente, C.G. de los Reyes-Gavilán, A. Margolles, M. Gueimonde & P. Ruas-Madiedo. 2014. Intestinal Microbiota in Health and Disease: Role of Bifidobacteria in Gut Homeostasis. *World J. Gastroenterol*, 20: 15163–15176.
- Turroni, F., E. Foroni, P. Pizzetti, V. Giubellini, A. Ribbera, P. Merusi, P. Cagnasso, B. Bizzarri, G. L. de'Angelis, F. Shanahan, D. van Sinderen, & M. Ventura. 2009. Exploring the Diversity of the Bifidobacterial Population in the Human Intestinal Tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(6): 1534-1545.
- Temmerman, R., G. Huys & J. Swings. 2004. Identification of Lactic Acid Bacteria: Culture-dependent and Culture-independent Methods. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7): 348–359.
- Uraipan, S. & T. Hongpattarakere. 2015. Antagonistic Characteristics Against Food-borne Pathogenic Bacteria of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Isolated from Feces of Healthy Thai Infants. *Jundishapur J. Microbiol.* 8(6): e18264.
- Ventura, M., F. Turroni, M.O.C. Motherway, J. MacSharry & D. van Sinderen. 2012. Host-microbe Interactions that Facilitate Gut Colonization by Commensal Bifidobacteria. *Trends Microbiol.* 20: 467–476.
- Vlková, E., L. Kalous, V. Bunešová, K. Rylková, R. Světlíková & V. Rada. 2012. Occurrence of Bifidobacteria and Lactobacilli in Digestive Tract of Some Freshwater Fishes. *Biologia*, 67: 411-416.
- Ward, D.M., M.J. Ferris, S.C. Nold & M.M. Bateson. 1998. A Natural View of Microbial Biodiversity within Hot Spring Cyanobacterial Mat Communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 1353–1370.
- Wei, L. 2019. *Bifidobacterium longum* strain ZJ1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MN372103.1> [diakses 21 Jan 2020].
- Xiao, W., F. Lin, & Y. Hou. 2019. The Complete Genome Sequence of *Bifidobacterium longum* BAMA-B05. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP043002.1> [diakses 21 Jan 2020].

Yatsunenکو, T., F. Rey, M. Manary, I. Trehan, M.G. Dominguez-Bello, M. Contreras, M. Magris, G. Hidalgo, R.N. Baldassano, A.P. Anokhin, A.C. Heath, B. Warner, J. Reeder, J. Kuczynski, J.G. Caporaso, C.A. Lozupone, C. Lauber, J.C. Clemente, D. Knights, R. Knight & J.I. Gordon. 2012. Human Gut Microbiome Viewed Across Age and Geography. *Nature*, 486: 222–227.